

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
(Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh)

Vergleichende Untersuchungen über Thromboplastische Eigenschaften der Blutzellen von Säuglingen und Erwachsenen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Rita Herber
aus Camberg

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
(Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh)

Vergleichende Untersuchungen über Thromboplastische Eigenschaften der Blutzellen von Säuglingen und Erwachsenen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Rita Herber
aus Camberg

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 2.2.1967

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof.Dr.med.et Dr.med.dent.H.Heuser
Referent: Prof.Dr.med.J.Oehme
Correferent: Prof.Dr.med.G.W.Löhr

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
A) Thromboplastinbildung	
B) Aufgabe und Ziel der vorliegenden Arbeit	
2. Methoden und Material	
A) Herstellung von Erythrocytenhämolysat	5
B) Herstellung von Leukocyten suspension	6
C) Bestimmung des Prothrombinverbrauchs	8
a) Herstellung der Eichkurve	8
b) Prothrombinverbrauchstest	11
3. Ergebnisse der Untersuchungen von	15
A) Erythrocytenhämolysat	16
B) Leukocyten suspension	23
4. Diskussion	31
A) Die thromboplastische Aktivität der Erythrocyten	31
B) Die thromboplastische Aktivität der Leukocyten	34
C) Die Sonderstellung des Nabelschnurblutes	35
D) Kritische Betrachtungen zu den Methoden	36
5. Zusammenfassung	38
6. Literaturverzeichnis	40

1. Einleitung

Die fest verhaftete Vorstellung, die Thrombocyten seien die einzigen an der physiologischen Blutgerinnung beteiligten Zellen, hat lange Zeit die Erforschung der thromboplastischen Eigenschaften von Erythrocyten und Leukocyten gehemmt. Zwar fand WOOLDRIDGE schon 1886, daß hämolysierende Erythrocyten eine mehr oder weniger ausgedehnte intravasculäre Gerinnung bewirken, aber erst seit kurzer Zeit wurde dieses Problem wieder aufgegriffen. So zeigten QUICK, SHINOWARA u.a., daß nicht nur Erythrocyten, sondern sogar Leukocyten am Gerinnungsablauf beteiligt sind.

QUICK nannte das thromboplastische Agens der roten Blutzellen " Erythrocytin" und wies nach, daß es im Plasma gebildet und an die Erythrocyten abgegeben wird.

Bei der Gerinnung reagiert Plättchenfaktor (3), der wahrscheinlich ein Phospholipid ist, mit einem Plasmabestandteil, der mit Faktor XII identisch ist (HAGEMAN). Bevor Faktor XII in vitro mit dem Plättchenfaktor reagieren kann, muß er durch eine benetzbare Oberfläche, z.B. Glas, aktiviert werden. Da es im Organismus keine glasähnliche Oberfläche gibt, nehmen QUICK und Mitarb. an, daß Thrombin selbst die Aktivierung bewirkt. Das Produkt der Reaktion ist ein Agens, das in seiner Aktivität und seiner chemischen Zusammensetzung mit dem Gerinnungsfaktor Erythrocytin identisch zu sein scheint, der in den Erythrocyten enthalten ist. Erythrocytin ist entscheidend an der Bildung des Plasma thromboplastins beteiligt (vgl. Abb. 1).

Langsame Aktivierung

Schnelle Aktivierung

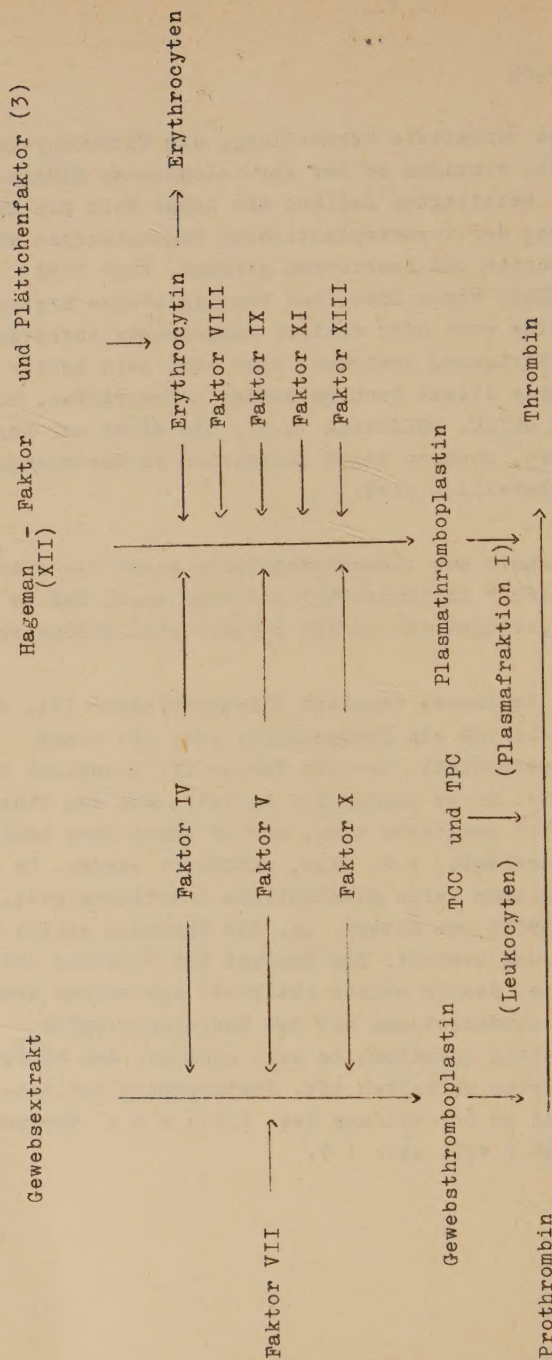


Abb. 1

Schematische Darstellung der Thromboplastin- und Thrombinbildung (Nach QUICK und SHINOWARA)
 TCC = Thromboplastische Zellkomponente, TPC = Thromboplastische Plasmakomponente

Die thromboplastische Komponente der Leukocyten wirkt dagegen, zusammen mit einer Plasmakomponente, die in den nicht koagulierbaren Globulinen der Plasmafraktion I gefunden wird (SHINOWARA) bei der Aktivierung von Prothrombin wie G e w e b s - thromboplastin.

Diese Zusammenhänge und die übrigen an der Bildung von Gewebs- und Plasmathromboplastin beteiligten Gerinnungsfaktoren sind in Abb. 1 dargestellt.

Das Zusammenwirken der Faktoren ist noch keineswegs restlos geklärt und es gibt Autoren, z.B. SEEGER, die einen Teil der bisher beschriebenen Gerinnungsfaktoren als Zwischenprodukte des Gerinnungsvorgangs auffassen, wobei das letzte Produkt der Vorphase als Prothrombinaktivator plötzlich größere Mengen Thrombin entstehen lässt.

Über die Gerinnungsaktivität der Erythrocyten und Leukocyten in den ersten Lebenstagen liegen bisher noch keine Mitteilungen vor. Auch vergleichende Untersuchungen über die thromboplastische Aktivität der Leukocyten von Säuglingen, besonders Neugeborenen, und Erwachsenen fehlen. Da wir bei den Besonderheiten des Gerinnungssystems in der Neugeborenenzeit (BELLER, KÜNZER, OEHME) und der verschiedenen Beschaffenheit von Neugeborenen- und Erwachsenen-erythrocyten altersabhängige Unterschiede der thromboplastischen Aktivität von Erythrocyten und möglicherweise auch Leukocyten vermuteten, versuchten wir folgende Fragen zu klären:

1. Ändert sich die thromboplastische Aktivität von Erythrocyten und Leukocyten in den ersten Lebenstagen ?

2. Besteht eine Altersabhängigkeit, insbesondere auch zwischen reif- und frühgeborenen Säuglingen ?
3. Besteht ein quantitativer Unterschied zwischen der thromboplastischen Aktivität von Erythrocyten und Leukocyten ?

2. Methoden und Material

=====

Alle verwendeten Gefäße und Kanülen wurden silikonisiert.

A. Herstellung von Erythrocytenhämolysat
(Methoden nach QUICK):

I) Material

- a) 3,8%iges Na-Citrat
- b) Aqua dest.

II) Ausführung

Das Citratblut (1 Teil Na-Citrat, 9 Teile Blut) wurde bei reifen Neugeborenen aus der Nabelschnur, bei allen übrigen Versuchspersonen durch Venenpunktion gewonnen. Wir zentrifugierten es zweimal 5 Min. bei 1000 U/min., saugten das überstehende thrombocyten- und leukocytenreiche Plasma nach jedem Zentrifugieren ab und ersetzten es durch physiologische Kochsalzlösung. Danach wurden die Erythrocyten bei 1500, 2000, 2500, 3000 und 3500 U/min. zentrifugiert und der jeweils abgesaugte Überstand durch isotone Na-Cl.-Lösung ersetzt. Diese Erythrocytensuspension enthielt keine oder nur vereinzelte Thrombocyten, jedoch zwischen 200 und 400 Leukocyten/ccm. Hämolyse wurde durch Zugabe von Aqua dest. und anschließendes Einfrieren bei -20°C erreicht.

Die Einstellung des Hb-Wertes erfolgte mit Aqua dest. nach dem letzten Zentrifugieren unter Berücksichtigung des normalen Hämatokritwertes. Er lag auf diese Weise zwischen 13 und 15 g%.

0,1 ccm dieses Hämolysats wurde zu 2 ccm Vollblut gegeben und im Prothrombinverbrauchstest das Serumprothrombin bestimmt.

B. Herstellung von Leukocyten suspension

Zur Isolierung von Leukocyten sind bisher nur wenige zuverlässige Methoden ausgearbeitet (PALMER,SKOOG, II, OSGOOD). Mit keiner Methode gelingt es, die Leukocyten vollkommen frei von Erythrocyten zu erhalten. Die im Folgenden beschriebene Methode beruht auf der Trennung von Erythrocyten und Leukocyten mit Hilfe der spezifisch erythrocytenagglutinierenden Wirkung des Phythämagglutinins.

I) Material

- a) 3%ige Dextranlösung (Pharmachem.Corp. Bethlehem, Pa.,Clinical Grade HH, M.W. 200 000 - 300 000, Lot HH 82 262)
3g Dextran ad 100 ml isotone NaCl-Lösung
- b) Eleparon (Leutpold)
- c) Phythämagglutinin-M-Lösung (DIFCO-Laboratories, Detroit, Code 052856, Prod.Description Control 456489)
Lösung des Inhalts einer 5 ml- Ampulle in 5 ml Aqua dest.(Lösung nach Vorschrift)
- d) Plastikkapillare 3 x 4 mm. Es wurden 10 cm lange Kapillaren verwendet, von denen ein Ende über dem Bunsenbrenner geschmolzen und mit der Flachzange zusammengedrückt wurde.

II) Ausführung

10 ml venösen Blutes wurden unter Heparinzusatz entnommen und sofort verarbeitet, da sonst nach unseren Erfahrungen die Leukocytenausbeute zu gering wird.

Das Blut wurde 1 : 3 mit der 3%igen Dextranlösung versetzt, also mit 20 ml. Jeweils 5 ml des Blutdextrange-misches wurden in 10 ml-Röhrchen über 20 Min. sedimen-

tiert. Nach Abheben und Vereinigen der Überstände erfolgte Zentrifugieren über 20 Min. bei 1200 U/Min. und Decantieren der Überstände.

Das Sediment wurde mit jeweils einem Tropfen der Phythamagglutinin-M-Lösung versetzt und nach 5 - 10 Min. mit einem dünnen Plastikschauch in die vorbereiteten Plastikcapillaren überführt. (Die Phythamagglutinin-M-Lösung kann je nach Fabrikationsserie von stärkerer Wirksamkeit sein und auch die Leukocyten zur Agglutination bringen. In diesem Fall empfehlen wir, sie vor dem Gebrauch durch isotone NaCl-Lösung zu verdünnen).

Ein Leerversuch mit Phythamagglutinin ergab keine veränderte Prothrombinzeit gegenüber Normalserum.

Die Plastikcapillaren wurden in passende Röhrchen geschoben und 5 Min. bei 300 U/min. zentrifugiert. Sie wurden dann dicht über den sedimentierten, agglutinierten Erythrocyten mit einer Rasierklinge durchtrennt.

Das überstehende leukocyten- und thrombocytenreiche Plasma-Dextrangemisch wurde je 10 Min. bei 1500 U/min. mit isotoner NaCl-Lösung gewaschen und der Überstand decantiert. Dadurch erhielten wir eine plättchenfreie Leukocytensuspension.

Sie wurde mittels isotoner NaCl-Lösung auf 7000 - 9000 Leukocyten eingestellt und erhielt noch etwa ebensoviel Erythrocyten. Ein Versuch mit einer Erythrocytensuspension von 7000 - 9000 Erythrocyten ergab keinen erhöhten Prothrombinverbrauch, so daß sie nicht berücksichtigt werden müssen.

0,1 ccm der Leukocytensuspension wurden zu 2 ccm Vollblut gegeben und im Prothrombinverbrauchstest das Serumprothrombin bestimmt.

C. Bestimmung des Prothrombinverbrauchs

a) Herstellung der Eichkurve

Der Prothrombinverbrauch wird in Prozenten des normalen Plasmaprothrombingehaltes angegeben. Die Prothrombinzeit steigt nichtlinear mit der Abnahme des Prothrombingehaltes an, sondern im Sinne einer Exponentialfunktion, wie Abb. 2 zeigt :

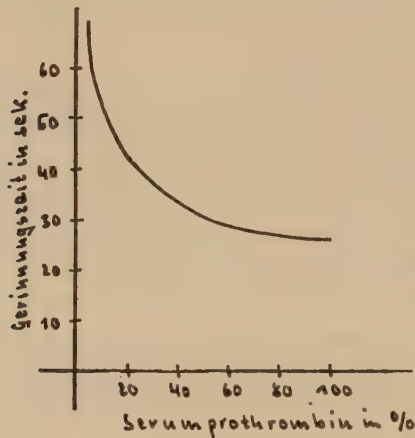


Abb.2

Abhängigkeit der Gerinnungszeit vom Prothrombingehalt
des Plasmas

Zur Darstellung des Prothrombinverbrauchs in Prozenten des normalen Plasmaprothrombingehaltes ist die Herstellung der Eichkurve nötig. Wir stellten aus Normalplasma von 8 Personen mindestens 5 Verdünnungen her. Die Ergebnisse wurden in ein vollogarithmisches Koordinatensystem eingetragen, um die Exponentialfunktion als Gerade darzustellen. Die Methode ist möglich, seit es QUICK gelang, ein annähernd konstantes Thromboplastin aus Kaninchenhirn herzustellen.

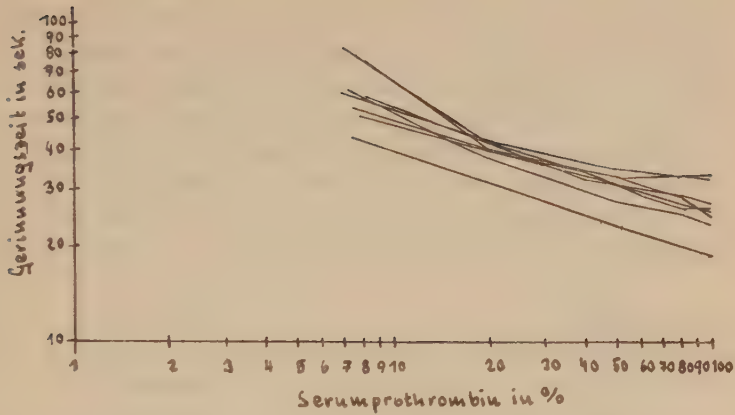


Abb. 3 (Erläuterung S. 8 : Herstellung der Eichkurve)
 Verdünnungsreihen aus Normalplasma von 8 Personen
 Logarithmische Darstellung der Gerinnungszeit in
 Abhängigkeit vom Prothrombingehalt des Plasmas

Die Mittelwerte der entsprechenden Verdünnungen wurden
 als Eichkurve in ein zweites logarothmisches
 Koordinatensvstem eingetragen.

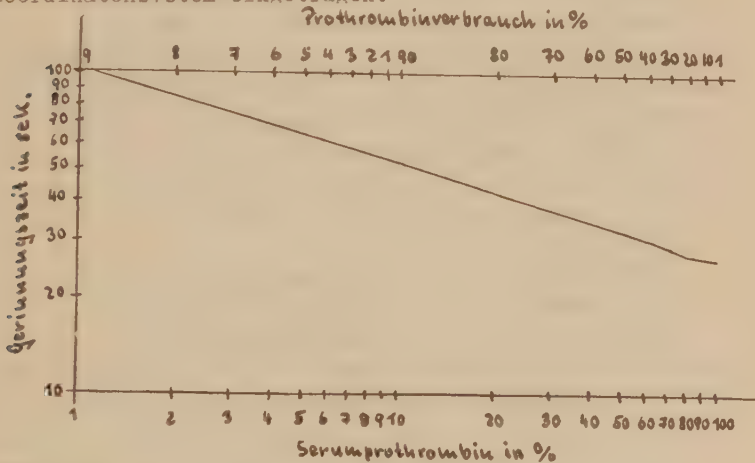


Abb. 4
 Mittelwertskurve aus 8 Verdünnungsreihen

Wie Abb. 4 zeigt, wird die Definition einer Geraden nur annähernd erfüllt. Wir verbanden die dargestellten Mittelwerte geradlinig und verlängerten die Gerade zwischen den Werten der 20%igen und 10%igen Verdünnung über den 10%-Wert hinaus. Da die Werte bei einer Verdünnung unter 10% wegen des starken Anstiegs der Exponentialfunktion sehr ungenau sind, ist die Fehlerquelle bei diesen Verfahren wesentlich geringer (HAGITTE).

I) Material

- a) Prothrombinreagens zur Schnellbestimmung - Behringwerke enthält: Faktor V, Faktor VII, Fibrinogen und Thrombokinese. Der Inhalt einer Ampulle wird in 1 ml Aqua dest. aufgelöst.
- b) m/40 Calciumchloridlösung
- c) 3,8%ige Na-Citratlösung (0,1 molar)
- d) Diäthylbarbitursäurepuffer (pH 7,6)

II Ausführung

Von einer Normalperson wird wie oben beschrieben Na-Citratplasma gewonnen (9 Teile Blut, 1 Teil 3,8%iges Na-Citrat). Das Plasma wird 1 : 10 mit Diäthylbarbitursäurepuffer - DP - (pH 7,6) verdünnt. Diese Verdünnung wird einem Plasma von 100% Prothrombingehalt der Norm gleichgesetzt. Sie bildet die Stammlösung - SL- folgender Verdünnungsreihe :

- 5 : 1 = 1 Teil SL auf 1/4 Teil DP
entspricht 80 % Prothrombingehalt
- 1 : 2 = 1 Teil SL auf 1 Teil DP
entspricht 50 % Prothrombingehalt
- 1 : 5 = 1 Teil SL auf 4 Teile DP
entspricht 20 % Prothrombingehalt
- 1 : 10 = 1 Teil SL auf 9 Teile DP
entspricht 10 % Prothrombingehalt

b) Prothrombinverbrauchstest

Um bei einem Gerinnungsvorgang den Prothrombinverbrauch feststellen zu können, ist es nötig, die Prothrombinkonzentration im Plasma und Serum zu bestimmen. Alle Bestimmungen erfolgen über eine Messung der Gerinnungszeit unter bestimmten Versuchsbedingungen. Die Konzentration eines Gerinnungsfaktors kann deshalb nicht in Absolutwerten angegeben werden, sondern in relativen Konzentrationen, wobei als Normalwert 100% angenommen wird.

1939 berichtete BRINKHOUS, der sich mit dem Nachweis von Gerinnungsfaktoren im Serum befaßte, daß Prothrombin im Serum normalerweise nicht mehr vorhanden ist, da es bei der Gerinnung verbraucht wird. Auf Grund dieser Beobachtungen gelangten QUICK und SOULIER zu folgender Überlegung : Da beim normalen Gerinnungsvorgang Prothrombin durch Thromboplastin in Thrombin umgewandelt wird, kann der Prothrombinverbrauchstest als indirektes Maß für das aktive Thromboplastin betrachtet werden.

Sie entwickelten die Methode der Serumprothrombinbestimmung, mit deren Hilfe jeder an der Gerinnung beteiligte Faktor, auch die thromboplastische Aktivität von Erythrocyten und Leukocyten, bestimmt werden kann. Die Serumprothrombinbestimmung (Prothrombinverbrauchstest) unterscheidet sich von der Plasma-prothrombinbestimmung nur durch Zusatz von Fibrinogen.

" Da bei allen Gerinnungsbestimmungen letzten Endes Thrombinkonzentrationen gemessen werden, dürfen die gesuchten Prothrombinkonzentrationen nur dann mit dem Thrombin gleichgesetzt werden, wenn der Nachweis erbracht ist, daß bei Ausführung der Gerinnungszeitbestimmung alles Prothrombin in Thrombin umgewandelt worden ist " (SCHULZE und SCHWICK)

Diese vollständige Umwandlung des Prothrombins wird durch Zusatz aller Acceleratoren zum Reaktionsgemisch erreicht. Die Wirkung des Plasmaantithrombins wird durch Verdünnung ausgeschaltet. Die Zeit, die ein Gemisch gleicher Teile von Plasma, Thromboplastinlösung und Ca-Cl-Lösung zur Gerinnung benötigt, ist ein indirektes Maß für die Prothrombinkonzentration des Plasmas. Diese Zeit heißt Quick- oder Prothrombinzeit. Es zeigte sich allerdings, daß die Prothrombinzeit nicht allein von der Prothrombinkonzentration abhängt, sondern eine Komplexbestimmung von Prothrombin, Faktor V/VI und VII ist. Die Bestimmung einzelner Faktoren war möglich, indem man alle Faktoren, mit Ausnahme des zu bestimmenden, in konstanter Menge zugab. Änderungen der Gerinnungszeit können dann nur durch unterschiedlichen Gehalt der zu bestimmenden Komponente bedingt sein.

I) Material

- a) 2 ccm Vollblut und 0,1 ccm Erythrocytenhämolysat bzw. 0,1 ccm Leukocyten suspension
- b) Prothrombinreagens zur Schnellbestimmung
Behringwerke enthält : Faktor V, Faktor VII, Fibrinogen und Thrombokinas. Der Inhalt einer Ampulle wird in 1 ml Aqua dest. aufgelöst.
- c) m/40 Calciumchloridlösung
- d) 3,8%ige Na-Citratlösung (0,1 molar)
- e) Diäthylbarbitursäurepuffer (pH 7,6)

II) Ausführung

Das Serum wurde unter den von QUICK angegebenen Bedingungen hergestellt:

Vollblut wurde durch eine Venenpunktion bei Personen mit normalem Gerinnungsstatus gewonnen. Etwa 2 ccm verwarfen wir , um die beim Einstich in die Kanüle gelangte Gewebsthrombokinas auszuspülen. Danach wurden 2 ccm Venenblut in Röhrchen, die schon 0,1 ccm Hämolysat bzw. Leukocytenaufschwemmung enthielten, aufgefangen. Ein Röhrchen enthielt keinen Zusatz und

diente als Bezugswert. Die Röhrchen wurden 60 Min. in einen Wärmeschrank bei 37°C gestellt. In dieser Zeit ist die Gerinnung eingetreten und die Retraktion hat begonnen. Nach 60 Min. wurde das Gerinnsel vorsichtig mit einem Glasstab von der Wand abgelöst und 5 Min. bei 2000 Umdrehungen zentrifugiert. Dabei wurde das Serum vom Gerinnsel getrennt.

Nun versetzten wir 0,45 ccm Serum mit 0,05 ccm 3,8%igem Na-Citrat, um den Prozess der Prothrombinumwandlung zu stoppen. Die Mischung wurde wieder 60 Min. im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit verschwindet das störende Thrombin.

Die Serumprothrombinbestimmung führten wir mit Hilfe des Einphasenverfahrens nach SCHULZE und SCHWICK durch. Es ist möglich, Prothrombin nach diesem Verfahren mit ausreichender Genauigkeit zu bestimmen, wenn das zu untersuchende Serum zu einem Substrat gegeben wird, das alle Gerinnungsfaktoren bis auf den zu ermittelnden im Überschuß enthält. Die resultierende Gerinnungszeit ist dann in einem weiten Konzentrationsbereich, von dem mit dem Serum zugeführten, im Substrat fehlenden Faktor abhängig.

Nach Ablauf der 60 Min. verdünnten wir das Serum 1 : 10 mit Diäthylbarbitursäurepuffer und schlossen den Prothrombinverbrauchstest an. Wir verdünnten 1:10 statt 1 : 20 um eine höhere Konzentration des zu untersuchenden Faktors zu erhalten und damit die Prothrombinzeit zu verlängern, um auch sehr kleine Unterschiede erfassen zu können.

Gerinnungszeitbestimmung

In das im Thermostat bei 37°C stehende Röhrchen, das eine Glasperle enthält, werden 0,2 ccm Serumverdünnung 1:10 und 0,2 ccm Prothrombinreagens pipettiert. Nach 20 - 30 Sek. werden 0,1 ccm m/40 Calciumchloridlösung hinzugefügt und sofort eine Stoppuhr in Gang gesetzt.

Der Inhalt des Reagensglases wird durch kurzes Umschwenken vermischt und die Gerinnung gestoppt. Sie ist am plötzlichen Stillstand oder Aufsteigen der Perle im sich drehenden Röhrchen erkennbar.
(Gerinnungsmesser der Firma F. Kniese/Marburg)

Die Bestimmung der Gerinnungszeit wurde stets zweimal durchgeführt. Lagen die Werte mehr als zwei Sekunden auseinander, führten wir die Bestimmung ein drittes Mal durch und klammerten den Wert, der am weitesten von den beiden anderen entfernt war, aus. Der Prothrombinverbrauch wurde auf der Eichkurve abgelesen.

3) Ergebnisse =====

Als Bezugswert für den durch Erythrocytenhämolysat und Leukocytensuspensionen bewirkten Prothrombinverbrauch diente uns die Serumprothrombinbestimmung von 4 gesunden Erwachsenen im Alter von 20 - 30 Jahren. Sie wurde insgesamt 40 mal ausgeführt, bevor wir diesem Venenblut die Testlösungen zusetzten (vgl. Tabl. 1) .

Tabelle 1 :

Prothrombinverbrauch im Serum gesunder Erwachsener (Bezugswerte)

Nr.	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch	Nr.	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch
1	51,0 sek.	88,5 %	21	42,8 sek.	80,0 %
2	53,5 "	90,0 %	22	57,2 "	92,5 %
3	50,5 "	88,1 %	23	55,0 "	90,8 %
4	45,2 "	80,7 %	24	57,1 "	92,5 %
5	66,7 "	95,4 %	25	52,3 "	89,0 %
6	62,3 "	94,0 %	26	57,1 "	92,5 %
7	54,0 "	91,0 %	27	55,8 "	92,0 %
8	69,0 "	96,2 %	28	51,4 "	88,8 %
9	79,2 "	97,7 %	29	58,0 "	93,0 %
10	70,7 "	96,4 %	30	56,6 "	92,2 %
11	73,8 "	97,6 %	31	56,6 "	92,2 %
12	42,6 "	80,0 %	32	59,1 "	93,3 %
13	53,8 "	90,5 %	33	51,7 "	89,0 %
14	54,0 "	91,0 %	34	56,8 "	92,3 %
15	63,0 "	94,5 %	35	58,8 "	93,4 %
16	49,2 "	87,0 %	36	56,8 "	92,3 %
17	52,5 "	89,0 %	37	60,8 "	92,0 %
18	58,1 "	92,5 %	38	57,1 "	92,4 %
19	57,3 "	92,3 %	39	57,9 "	93,0 %
20	53,0 "	89,5 %	40	55,0 "	91,4 %

Das Serumprothrombin dieser vier Personen weist eine große Streuung auf. Es liegt zwischen 20 und 2,3%, das entspricht einem Prothrombinverbrauch von 80 beziehungsweise 97,7%.

Dieser ausgedehnte Streubereich zeigt die individuelle Besonderheit der physiologischen Blutgerinnung, die auch DRESKIN bestätigt. Bei einem Mittelwert des Serumprothrombins von 9% ist der mittlere Prothrombinverbrauch 91%.

Im Folgenden wird nur noch der Prothrombinverbrauch, nicht mehr das Serumprothrombin angegeben.

A. Erythrocytenhämolysat

Wir untersuchten die thromboplastische Aktivität des Erythrocytenhämolysats im Nabelschnurblut (a), bei reifen (b) und unreifen Neugeborenen (c), sowie bei Säuglingen im ersten Halbjahr (d) und Erwachsenen (e) .

a) Nabelschnurblut (n = 72)

Das Nabelschnurblut wurde sofort nach der Geburt aus der placentanahen Seite gewonnen. Es nimmt eine Sonderstellung ein, da es trotz der erniedrigten Konzentration der Gerinnungsfaktoren (BELLER) eine Hyperkoagulabilität besitzt. Möglicherweise sind eine Vermehrung des Placentathromboplastins und eine Erhöhung der Fibrinolyseaktivierung dafür verantwortlich.

Tabelle 2 :

Prothrombinverbrauch des Erythrocytenhämolysats aus Nabelschnurblut

Nr.	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch	Nr.	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- Verbrauch
1	76,8 sek.	97,3 %	37	62,8 sek	94,5 %
2	82,3 "	97,8 %	38	58,0 "	93,0 %
3	91,9 "	98,6 %	39	59,4 "	93,5 %
4	74,0 "	97,0 %	40	51,0 "	89,0 %
5	79,2 "	97,7 %	41	55,5 "	91,5 %
6	71,9 "	96,6 %	42	56,1 "	92,0 %
7	66,8 "	95,4 %	43	54,7 "	91,3 %
8	72,0 "	96,6 %	44	61,0 "	94,0 %
9	56,7 "	92,0 %	45	61,5 "	94,2 %
10	61,2 "	94,0 %	46	61,1 "	94,0 %
11	69,3 "	96,3 %	47	59,7 "	93,7 %
12	78,7 "	98,3 %	48	58,3 "	93,4 %
13	96,2 "	98,8 %	49	58,1 "	93,4 %
14	79,8 "	97,7 %	50	61,5 "	94,0 %
15	81,5 "	97,8 %	51	61,6 "	94,0 %
16	61,8 "	94,0 %	52	60,5 "	93,6 %
17	68,8 "	96,2 %	53	58,7 "	93,5 %
18	58,9 "	93,5 %	54	54,2 "	91,0 %
19	55,5 "	91,5 %	55	59,8 "	93,6 %
20	71,9 "	96,6 %	56	58,7 "	93,4 %
21	59,6 "	93,7 %	57	58,6 "	93,4 %
22	59,0 "	93,5 %	58	61,5 "	94,0 %
23	65,6 "	95,6 %	59	63,0 "	94,9 %
24	58,6 "	93,0 %	60	54,5 "	91,0 %
25	61,1 "	94,0 %	61	52,1 "	89,0 %
26	60,1 "	93,6 %	62	55,5 "	91,3 %
27	57,2 "	93,0 %	63	51,2 "	89,5 %
28	52,6 "	89,8 %	64	54,4 "	91,1 %
29	57,6 "	92,0 %	65	54,4 "	91,1 %
30	58,8 "	93,3 %	66	56,9 "	92,0 %
31	54,4 "	91,0 %	67	59,6 "	93,5 %
32	56,3 "	92,0 %	68	60,5 "	93,6 %
33	52,3 "	90,0 %	69	58,1 "	93,0 %
34	61,7 "	94,0 %	70	53,2 "	90,5 %
35	75,5 "	97,1 %	71	55,0 "	91,2 %
36	51,3 "	89,0 %	72	54,0 "	91,0 %

Der Prothrombinverbrauch des Erythrocytenhämolysats liegt in einem Streubereich von 89,0 und 98,8%. Der Mittelwert beträgt 94,4 %; er ist also um 3,4 % höher als im Normalserum (s. Bezugswert).

Die Differenz zweier Mittelwerte gilt als signifikant, wenn die nach der Methode von FISCHER und YATES berechnete Wahrscheinlichkeit p kleiner als 0,05 ist. Für das Erythrocytenhämolysat aus Nabelschnurblut ist p kleiner als 0,001. Die Erhöhung des Prothrombinverbrauchs gegenüber dem Bezugswert ist also signifikant. (Die Streuung der Werte ist geringer als beim Normalserum Erwachsener.)

b) Reife Neugeborene

Alter 1 - 14 Tage ($n = 31$)

Die thromboplastische Aktivität des Erythrocytenhämolysats von reifen Neugeborenen ist geringer als im Nabelschnurblut

Tabelle 3 :

Prothrombinverbrauch des Erythrocytenhämolysats von reifen Neugeborenen

Nr.	Alter (Tage)	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch	Nr.	Alter (Tage)	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch
1	1	54,3 sek	91,4 %	17	6	54,2 sek.	91,1 %
2	1	59,3 "	93,3 %	18	7	80,4 "	97,7 %
3	1	59,9 "	93,7 %	19	7	54,6 "	91,0 %
4	1	61,5 "	94,3 %	20	8	61,5 "	88,7 %
5	2	59,5 "	93,5 %	21	8	51,4 "	89,0 %
6	2	48,1 "	87,0 %	22	9	59,0 "	93,3 %
7	2	94,5 "	98,7 %	23	10	57,4 "	92,3 %
8	3	55,9 "	91,6 %	24	10	61,4 "	94,3 %
9	3	57,3 "	92,2 %	25	10	60,9 "	93,8 %
10	3	81,3 "	97,8 %	26	10	56,6 "	92,0 %
11	4	57,3 "	92,2 %	27	11	59,2 "	93,4 %
12	4	42,5 "	89,9 %	28	12	60,5 "	94,0 %
13	4	55,7 "	92,0 %	29	12	68,2 "	95,8 %
14	5	53,3 "	93,0 %	30	13	56,3 "	92,0 %
15	5	43,0 "	81,0 %	31	14	60,4 "	94,0 %
16	6	56,3 "	92,0 %				

Der Prothrombinverbrauch liegt in einem Bereich von 81 und 98,7%. Der Mittelwert beträgt 93,5 %, ist also um 2,5 % gegenüber dem Bezugswert erhöht. p ist kleiner als 0,01. Eine Abhängigkeit vom Lebens- tag kann nicht festgestellt werden (s. Abb. 5)

5 der Neugeborenen hatten einen Morbus haemolyticus neonatorum (8, 9, 11, 13, 14). Diese Kinder zeigten keine vom Mittelwert stark abweichenden Werte. Auch nach FISCHER wird die Aktivität der Gerinnungs- faktoren durch Bilirubin nicht beeinflusst .

c) Unreife Neugeborene

Alter 1 - 7 Tage (n = 11)

Bei den in der ersten Lebenswoche untersuchten Früh- geborenen liegt der Prothrombinverbrauch des Erythro- cytenhämolysats zwischen 89,5 und 96,8 %. Der Mittel- wert beträgt 93,8 % und ist damit um 2,8 % höher als der Bezugswert. p ist kleiner als 0,01. Die Erythrocyten Frühgeborener zeigen demnach keine Abweichung ihrer Gerinnungsaktivität gegenüber reifen Neugeborenen, wie man bei den Besonderheiten der Reife und des Funktionswandels hätte erwarten können.

Es kann auch hier weder eine Abhängigkeit des Pro- thrombinverbrauchs vom Lebenstag festgestellt werden (vgl. Abb. 6), noch haben die hohen Bilirubinwerte bei drei der Kinder (5, 8, 9) eine Bedeutung.

Tabelle 4 :

Prothrombinverbrauch des Erythrocytenhämolysats von unreifen Neugeborenen

Nr.	Alter	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch
1	1	55,9 sek.	91,8 %
2	2	56,2 "	92,0 %
3	2	60,8 "	94,0 %
4	3	61,2 "	94,0 %
5	3	58,5 "	93,0 %
6	4	60,4 "	93,9 %
7	5	61,0 "	94,0 %
8	6	52,2 "	89,5 %
9	6	61,7 "	94,3 %
10	7	73,2 "	96,8 %
11	7	62,7 "	94,5 %

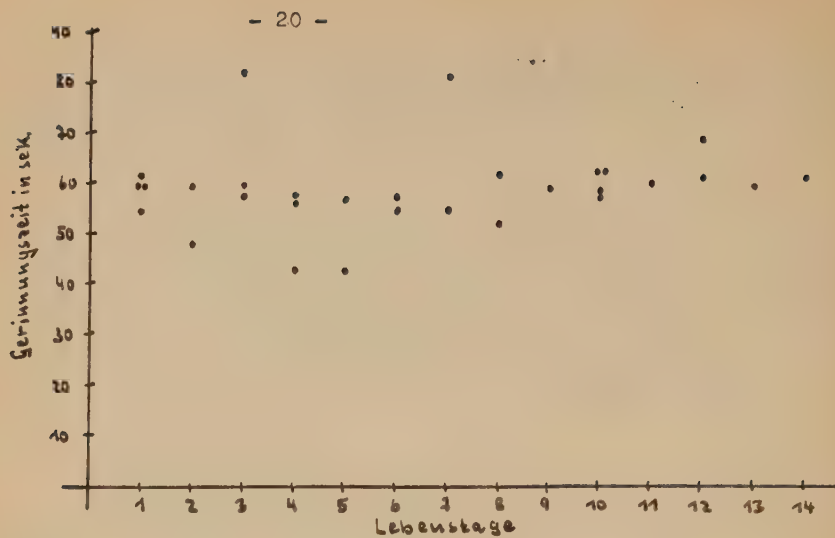


Abb. 5

Thromboplastische Aktivität der Erythrocyten von reifen
Neugeborenen

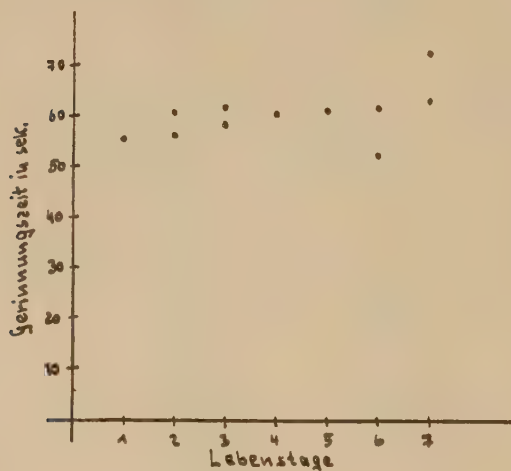


Abb. 6

Thromboplastische Aktivität der Erythrocyten von unreifen
Neugeborenen

d) Säuglinge

Alter 1 - 6 Monate (n = 10)

Der Prothrombinverbrauch bei Säuglingen im ersten Lebenshalbjahr liegt in dem geringen Streubereich zwischen 92 und 96,7 % (vgl. Tab. 5). Der Mittelwert beträgt 93 %, ist also um 2 % gegenüber dem Bezugswert erhöht. p ist kleiner als 0,05. Somit ist der Unterschied der beiden Werte noch signifikant. Bei der geringen Abweichung vom Mittelwert ist keine Abhängigkeit des Prothrombinverbrauchs vom Alter zu erkennen (vgl. Abb.7).

Einer der Säuglinge (vgl. Nr.5) hatte ein Adrenogenitales Syndrom. Auch dieser Wert weicht nicht vom Mittelwert ab.

Tabelle 5 :

Prothrombinverbrauch des Erythrocytenhämolysats von Säuglingen

Nr.	Alter	Gerinnungszeit	Prothrombinverbrauch
1	1 Mon.	57,5 sek.	92,4 %
2	2 "	61,5 "	92,3 %
3	2 "	54,5 "	92,0 %
4	2 "	54,7 "	92,1 %
5	3 "	58,0 "	93,0 %
6	4 "	57,3 "	92,5 %
7	6 "	54,2 "	92,0 %
8	6 "	54,5 "	92,0 %
9	6 "	71,6 "	96,7 %
10	6 "	59,0 "	93,4 %

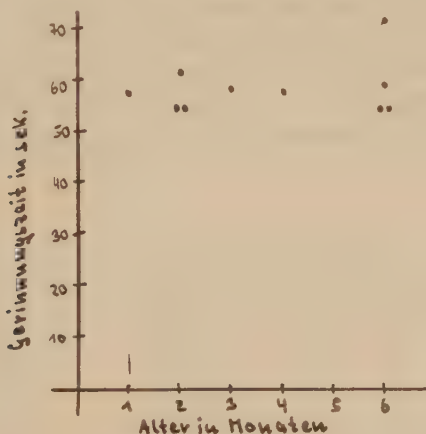


Abb. 7
Thromboplastische Aktivität der Erythrocyten von Säuglingen

e) Erwachsene (n = 22)

Das Erythrocytenhämolysat Erwachsener wurde vorwiegend aus Blut von männlichen Spendern gewonnen. Die weiblichen Spender befanden sich außerhalb der letzten und ersten Tage des Cyclus.

Tabelle 6 :

Prothrombinverbrauch des Erythrocytenhämolysats Erwachsener

Nr.	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch	Nr.	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch
1	66,9 sek.	95,6 %	12	58,4 sek	93,2 %
2	86,0 "	98,3 %	13	65,3 "	95,3 %
3	68,3 "	96,0 %	14	61,4 "	94,0 %
4	62,7 "	94,6 %	15	61,8 "	94,1 %
5	62,5 "	94,5 %	16	55,5 "	91,5 %
6	76,0 "	97,3 %	17	73,0 "	96,8 %
7	62,5 "	94,5 %	18	62,5 "	94,5 %
8	55,2 "	91,5 %	19	60,5 "	94,0 %
9	59,1 "	93,5 %	20	59,0 "	93,4 %
10	59,0 "	93,5 %	21	45,0 "	80,0 %
11	58,5 "	93,2 %	22	66,7 "	95,6 %

Die Höhe des Prothrombinverbrauchs liegt in einem Streubereich von 80 und 98,3 % (vgl. Tab. 6). Der Mittelwert beträgt 94,6%, ist also um 3,6 % höher als der Bezugswert. p ist kleiner als 0,01.

Auch bei den Erythrocyten Erwachsener sehen wir die gleich starke Streuung des Serumprothrombinverbrauchs wie im Vollblut. Wir schließen daraus, daß auch die thromboplastische Aktivität der Erythrocyten genau wie die Blutgerinnung beim Erwachsenen größeren individuellen Schwankungen unterworfen ist als in anderen Lebensaltern.

B. Leukocyten suspension

Wir untersuchten die thromboplastische Aktivität der Leukocyten suspension im Nabelschnurblut (a), bei reifen Neugeborenen (b) und Säuglingen (c), bei Frühgeborenen (d) und Erwachsenen (e) .

a) Nabelschnurblut (n = 30)

Tabelle 7 :

Prothrombinverbrauch der Leukocyten suspension aus Nabelschnurblut

Nr.	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch	Nr.	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch
1	59,9 sek.	93,6 %	16	63,0 sek.	94,7 %
2	59,5 "	93,5 %	17	62,5 "	94,2 %
3	61,3 "	94,0 %	18	56,6 "	92,0 %
4	45,2 "	83,0 %	19	58,1 "	93,0 %
5	51,8 "	89,0 %	20	54,2 "	91,0 %
6	43,5 "	81,0 %	21	54,9 "	91,5 %
7	43,4 "	81,0 %	22	53,5 "	90,5 %
8	64,0 "	95,0 %	23	54,5 "	91,0 %
9	58,8 "	93,3 %	24	56,4 "	92,0 %
10	66,7 "	95,6 %	25	57,6 "	92,8 %
11	66,3 "	95,5 %	26	57,5 "	92,8 %
12	61,7 "	94,2 %	27	58,0 "	93,0 %
13	64,5 "	95,2 %	28	58,2 "	93,0 %
14	61,6 "	94,2 %	29	56,9 "	92,7 %
15	62,0 "	94,3 %	30	58,2 "	93,0 %

Der Prothrombinverbrauch zeigt innerhalb der untersuchten Leukocyten suspension die größte Streuung. Er liegt zwischen 81,0 und 95,6 % (vgl. Tab. 7). Der Mittelwert ist 92,9 %, also 1,9% höher als der Bezugswert. p ist kleiner als 0,05.

b) Reife Neugeborene

Alter 1 - 14 Tage (n = 12)

Tabelle 8 :

Prothrombinverbrauch der Leukocyten suspension von reifen Neugeborenen

Nr.	Alter (Tage)	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch	Nr.	Alter (Tage)	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch
1	1	58,3 sek.	92,9 %	7	5	58,5 sek.	93,2 %
2	2	57,3 "	92,5 %	8	5	57,6 "	92,5 %
3	2	58,0 "	93,0 %	9	6	60,3 "	93,7 %
4	3	56,5 "	92,0 %	10	11	55,0 "	91,3 %
5	3	59,4 "	93,5 %	11	14	56,7 "	92,0 %
6	4	57,7 "	92,6 %	12	14	58,0 "	93,0 %

c) Säuglinge

Alter 1 - 6 Monate (n = 7)

Tabelle 9 :

Prothrombinverbrauch der Leukocyten suspension von
Säuglingen

Nr.	Alter	Gerinnungszeit	Prothrombinverbrauch
1	4 Wo.	58,4 sek.	92,9 %
2	6 Wo.	57,5 "	92,5 %
3	6 Wo.	57,3 "	92,5 %
4	9 Wo.	57,8 "	92,6 %
5	5 Mon.	56,8 "	92,0 %
6	6 Mon.	59,9 "	93,6 %
7	6 Mon.	56,6 "	92,0 %

Der Prothrombinverbrauch der Leukocyten suspension von reifen Neugeborenen und Säuglingen liegt innerhalb eines geringen Streubereiches von 91,3 und 93,7 % (vgl. Tab. 9). Der Mittelwert ist 92,7 %, also um 1,7 % höher als der Bezugswert. p ist kleiner als 0,05.

Alle Werte weichen nur geringgradig vom Mittelwert ab. Die thromboplastische Aktivität der Leukocyten suspension von reifen Neugeborenen und Säuglingen unterscheidet sich nicht (vgl. Abb. 8).

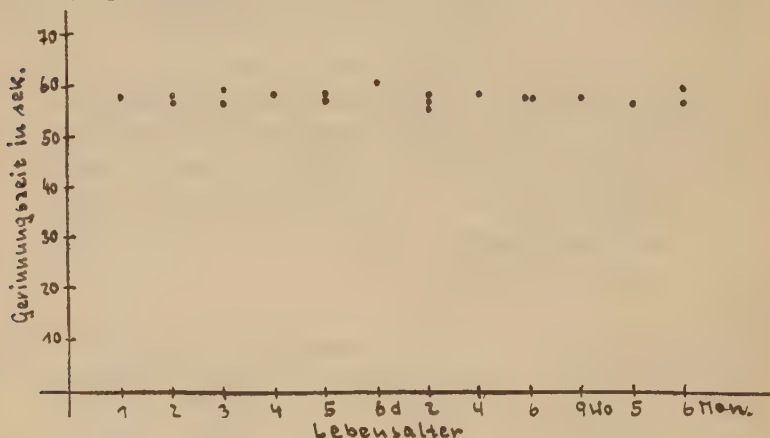


Abb. 8

Thromboplastische Aktivität der Leukocyten bei Neugeborenen und Säuglingen in den ersten 6 Monaten.

d) Frühgeborene

Alter 1 - 8 Wochen (n = 10)

Tabelle 10 :

Prothrombinverbrauch der Leukocyten suspension von
Frühgeborenen

Nr.	Alter	Gerinnungszeit	Prothrombinverbrauch
1	6 d	55,1 sek.	91,5 %
2	8 d	54,9 "	91,2 %
3	3 Wo.	59,0 "	93,3 %
4	3 Wo.	56,5 "	92,0 %
5	3 Wo.	57,8 "	92,6 %
6	3 Wo.	57,4 "	92,5 %
7	5 Wo.	57,5 "	92,5 %
8	5 Wo.	56,4 "	92,0 %
9	6 Wo.	59,2 "	93,4 %
10	8 Wo.	57,8 "	92,6 %

Die Leukocyten suspension der Frühgeborenen ergab einen Prothrombinverbrauch zwischen 91,2 und 93,4 %. Die Streuung ist ebenso wie bei den reifgeborenen Säuglingen und Neugeborenen sehr gering (vgl. Tab. 9 und 10). Der Mittelwert beträgt 92,5 %, ist also um 1,5 % höher als der Bezugswert. p ist 0,05 und liegt damit an der untersten Grenze, die uns erlaubt, von Signifikanz zu sprechen.

Eine Abhängigkeit des Prothrombinverbrauchs vom Alter kann auch bei Frühgeborenen nicht festgestellt werden (vgl. Abb. 9). Ob die etwas niedrigen Werte der 6 und 8 Tage alten Kinder (vgl. Nr. 1, 2) eine Bedeutung haben, kann auf Grund der kleinen Zahl nicht entschieden werden.

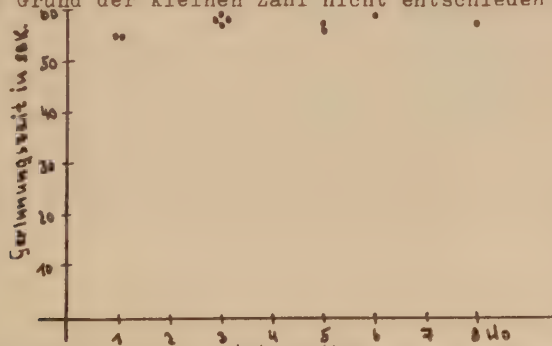


Abb. 9

Thromboplastische Aktivität der Leukocyten bei Frühgeborenen

e) Erwachsene (n = 25)

Die Erwachsenen, deren Leukocyten untersucht wurden, waren hauptsächlich Spender der Blutbank.

Tabelle 11 :

Prothrombinverbrauch der Leukocyten suspension von Erwachsenen

Nr.	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch	Nr.	Gerinnungs- zeit	Prothrombin- verbrauch
1	64,0 sek.	95,4 %	14	58,0 sek.	93,0 %
2	47,2 "	85,5 %	15	57,6 "	92,6 %
3	53,6 "	90,0 %	16	57,2 "	92,3 %
4	65,6 "	95,4 %	17	57,5 "	92,6 %
5	56,1 "	92,0 %	18	57,6 "	92,6 %
6	56,7 "	92,5 %	19	57,0 "	92,5 %
7	58,0 "	92,0 %	20	57,0 "	92,5 %
8	55,6 "	91,5 %	21	57,1 "	92,5 %
9	54,1 "	91,0 %	22	57,8 "	93,0 %
10	53,2 "	90,0 %	23	56,5 "	92,0 %
11	54,5 "	91,2 %	24	59,3 "	93,5 %
12	59,9 "	93,5 %	25	60,7 "	94,0 %
13	58,3 "	93,0 %			

Die Streuung der Werte ist wie beim Nabelschnurblut höher als in der Neugeborenen- und Säuglingszeit (vgl. Tab.7) . Sie liegen zwischen 85,5 und 95,4 %. Der Mittelwert ist 92,5 %, also um 1,5 % höher als der Bezugswert. p ist wie bei den Frühgeborenen nur 0,05.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Höhe des Prothrombinverbrauchs von Erythrocytenhämolysat bzw. von Leukocyten suspensionen unabhängig vom Prothrombinverbrauch des Venenblutes ist, dem sie zugesetzt werden.

Keiner der Werte lag unter 80 oder über 98,8 %. Ein Serumprothrombinverbrauch unter 85 % wird von DRESKIN

schon als pathologisch gewertet. Da sich bei den drei Personen, deren Serumprothrombinverbrauch unter 85 % lag, und den 5 , deren Erythrocyten oder Leukocyten einen pathologischen Prothrombinverbrauch bewirkten, keine klinischen Zeichen einer Hämorrhagie manifestierten, kann diese Abweichung von der Norm auch methodisch bedingt sein.

Die Mittelwerte lagen alle über 91 %, die meisten um 93 %. Tabelle 12 soll unsere Ergebnisse noch einmal in übersichtlicher Form zusammenfassen. Sie macht die stärkere Gerinnungsaktivität des Erythrocytenhämolysats gegenüber der Leukocytensuspension besser deutlich als die Abbildung 10.

	Prothrombinverbrauch		
	n = 40	91 %	
Normalserum	Erythrocytenhämolyse		
			Leukocyten suspension
Nabelschnur- blut	n = 72	94,4 %	n = 30 92,9 %
Frühgeborene	n = 11 2 - 7d	93,8 %	n = 10 1 - 8Wo 92,5 %
Reife Neugeborene	n = 31 1 - 14d	93,5 %	n = 12 1 - 14d 92,7 %
Säuglinge	n = 10 1 - 6Mon.	93,0 %	n = 7 1 - 6Mon. 92,6 %
Erwachsene	n = 22	94,6 %	n = 25 92,5 %

Tabelle 12 :
Gegenüberstellung des Prothrombinverbrauchs von Normalserum, Erythrocytenhämolyse
und Leukocyten suspension in verschiedenen Lebensaltern

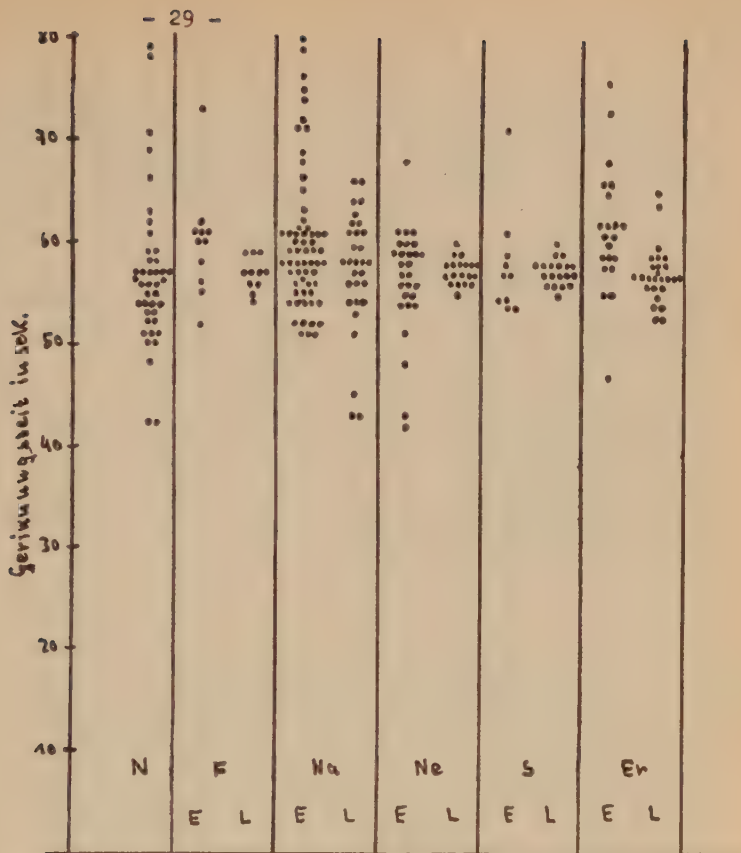


Abb. 10

Darstellung der Gerinnungsaktivität von Erythrocyten und Leukocyten in verschiedenen Lebensaltern, im Vergleich zum Normalserum.

N = Normalserum

Ne = Neugeborene

F = Frühgeborene

S = Säuglinge

Na = Nabelschnurblut

Er = Erwachsene

E = ErythrocytenhämolySAT

L = Leukocytensuspension

Der Serumprothrombinverbrauch der Erythrocytenhämolysate liegt über 93 %. Die höchsten Werte erreichen Erwachsenen-erythrocyten (94,6 %) und Nabelschnurerythrocyten (94,4 %). Bei unreifen (93,8 %) und reifen Neugeborenen (93,5 %) ist der Prothrombinverbrauch etwas höher als bei Säuglingen im ersten Halbjahr (93 %). Allerdings werden die Bedingungen der Signifikanz nur von Nabelschnur- und Erwachsenenerythrocyten auf der einen und Erythrocyten von Säuglingen auf der anderen Seite erfüllt ($p = 0,05$) .

Die Leukocytensuspensionen zeigen ein einheitlicheres Bild. Die Mittelwerte liegen alle zwischen 92,5 und 92,9 % und damit niedriger als der Serumprothrombinverbrauch der Erythrocytenhämolysate. Eine signifikante Differenz zwischen den einzelnen Ergebnissen besteht nicht.

Die Größe der thromboplastischen Aktivität von Erythrocyten und Leukocyten ist wegen der verschiedenen Zellzahl der Testlösungen (4 Millionen Erythrocyten und 8000 bis 9000 Leukocyten) nicht vergleichbar. Ein Versuch mit einem Hämolysat von etwa 9000 Erythrocyten, der keine Erhöhung des Serumprothrombinverbrauchs ergab, läßt sogar den Schluß zu, daß die thromboplastische Aktivität der Leukocyten größer ist als die der Erythrocyten.

4. Diskussion

=====

A. Die thromboplastische Aktivität der Erythrocyten

Nach QUICK und Mitarbeitern ist das Erythrocytin dem Gerinnungsfaktor der Thrombocyten ähnlich, in seiner Wirkung aber unabhängig von ihm. Das vom Hämolysat isolierte Erythrocytin erkannten sie auf Grund seines Stickstoff-Phosphor-Verhältnisses und seiner chemischen Eigenschaften als Phospholipid: es greift direkt in den Gerinnungsablauf ein. Thrombocyten reagieren dagegen erst mit dem Hagemann-Faktor, der erst aktiviert werden muß. Den Verdacht, daß Hämoglobin selbst die beobachteten Effekte am Gerinnungssystem auslöst, konnte KÜNZER entkräften, denn die Umwandlung von Oxyhämoglobin in andere Blutfarbstoffderivate, beeinflußt die Aktivität der Hämolysate nicht.

Die physiologische Bedeutung des Erythrocytins in den roten Zellen ist vorerst unbestimmt. Jedenfalls aber wird ein Gerinnungsfaktor freigesetzt, wenn Erythrocyten massiv abgebaut werden. Dadurch wird eine Gerinnung eingeleitet, ähnlich dem Vorgang, den man beobachtet, wenn Hämolysat zu Vollblut gegeben wird.

Um den Angriffspunkt des Erythrocytins am Gerinnungssystem näher zu kennzeichnen, führte KÜNZER zwei Versuchsreihen durch:

Er untersuchte den Einfluß von Erythrocytenhämolysat auf den Prothrombinverbrauch von recalcifiziertem Normalplasma und fand ihn beträchtlich erhöht.

In der zweiten Versuchsreihe gab er zu einer Prothrombinlösung Calcium und Thromboplastin beziehungsweise Hämolysat. Das Erythrocytenhämolysat konnte die Wirkung des

Thromboplastins weitgehend ersetzen. Dagegen gerannen Fibrinogenlösungen nach Zugabe von Hämolysat nicht. Somit wirkt Erythrocytin auf die erste Gerinnungsphase, hat also einen thromboplastinähnlichen Effekt.

Nach den Angaben von QUICK ist Erythrocytin nicht aus intakten Erythrocyten zu gewinnen. McKELLAR und DACIE erbrachten jedoch den Beweis, daß auch intakte Erythrocyten Material mit thromboplastischer Aktivität freisetzen. Rote Zellen von Personen mit paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie geben nach Inkubation in ihrem eigenen Plasma bei 37°C beträchtliche Mengen eines thromboplastischen Agens ab, ohne zu hämolysieren. Normale Erythrocyten tun dies in viel geringerem Ausmaß. Auch QUICK hatte aus Erythrocyten bei der Gerinnung in vitro Erythrocytin erhalten, aber eine mechanische Verletzung der roten Blutzellen vermutet. Die Tatsache, daß auch intakte Erythrocyten Gerinnungsmaterial freisetzen führte zu der Frage, ob dies unter physiologischen Bedingungen Bedeutung haben könnte.

Nach McKELLAR und DACIE scheint die Abgabe großer Mengen eines thromboplastischen Agens nicht spezifisch für einen Typ abnormer Erythrocyten zu sein, sondern ein Merkmal vieler hämolytischer Anämien. Da fast allen die vermehrten Reticulocyten gemeinsam sind, die eine höhere Lipidkonzentration haben als ältere Erythrocyten und wahrscheinlich Lipide aufbauen, vermutete man in ihnen mehr Gerinnungsmaterial als in reifen Erythrocyten.

BRADLOW ging den Vermutungen nach und bestätigte, daß Reticulocyten viel größere Mengen von Gerinnungsmaterial enthielten als reife Erythrocyten. Da auch bei Neugeborenen ein erhöhter Zellzerfall und vermehrte Reticulocytenzahlen (50 %) bestehen, können die verminderten Gerinnungsfaktoren durch gerinnungsfördernde Substanzen aus Reticulocyten und Erythrocyten kompensiert werden.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen bestätigen diese Überlegung. Wir fanden die thromboplastische Aktivität der Erythrocyten im Nabelschnurblut und bei Neugeborenen höher als bei Säuglingen im ersten Lebenshalbjahr. Beim Nabelschnurblut sind außer den vermehrten Reticulocyten noch andere Faktoren maßgebend. Sie sollen in einem besonderen Abschnitt betrachtet werden.

Eine Änderung der thromboplastischen Aktivität der Erythrocyten in den ersten Lebenstagen, die man auf Grund des Ablaufs von Erythrocytenabbau und Neubildung hätte erwarten können, konnten wir nicht nachweisen. Es fehlt uns auch die Erklärung, für die bei Erwachsenen, in Übereinstimmung mit KÜNZER, ebenfalls große thromboplastische Aktivität der Erythrocyten. Sie entspricht in ihrem Ausmaß den Nabelschnurer erythrocyten, und ist damit etwas höher als bei Neugeborenen.

Nach den bisher durchgeführten Untersuchungen ist zwar der Unterschied zwischen Hämoglobin A und Hämoglobin F für die thromboplastische Aktivität der Erythrocyten nicht maßgebend; Neugeborenen- und Erwachsenen erythrocyten unterscheiden sich aber noch in vieler Hinsicht, besonders in ihrem Fermentsystem, so daß ein Unterschied im Ausmaß der thromboplastischen Aktivität durchaus zu erwarten wäre. Die Übereinstimmung bei Neugeborenen und Erwachsenen ist vorerst nicht zu deuten, denn der Erythrocytenabbau und die Reticulocytenzahl ist beim Neugeborenen eindeutig höher als beim Erwachsenen. Auch bei reifen und unreifen Neugeborenen fanden wir keinen Unterschied der Gerinnungsaktivität, da die Blutneubildung bei Frühgeborenen nicht schneller vonstatten geht als bei reifen Neugeborenen.

B. Die thromboplastische Aktivität der Leukocyten

SHINOWARA beschrieb die Isolierung und Charakterisierung zweier Substanzen des menschlichen Blutes, der thromboplastischen Zellkomponente (TCC) und der in der Plasmafraktion I gefundenen thromboplastischen Plasmakomponente (TPC). Die thromboplastische Zellkomponente wird nicht nur in Plättchenextrakten gefunden, sondern auch in thrombocytenarmen und erythrocytenarmen Leukocytenfraktionen. Das ist die Erklärung dafür, daß Personen mit niedrigen Thrombocytenzahlen normale Gerinnungszeiten haben können.

TPC und TCC unterscheiden sich sowohl in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften, als auch im Ursprung weitgehend, sie haben aber einen ähnlichen biologischen Effekt. Zusammen, nicht getrennt, wirken sie wie Gewebsthromboplastin. SHINOWARA nimmt eine stöchiometrische Beziehung zwischen den Substanzen an. Wenn TPC und TCC mit Prothrombin reagieren, wird auch ohne Beteiligung von Thromboplastin Thrombin gebildet.

GOLLUB untersuchte die thromboplastischen Fähigkeiten der Blutzellen mit Hilfe des Enzyms "Thromboplastinase". Außer Thrombocyten und Erythrocyten bewirkten auch die Leukocyten in seinen Versuchen eine Verkürzung der Plasmagerinnungszeit.

Bei unseren Untersuchungen zeigte sich die thromboplastische Aktivität der Leukocyten bei Säuglingen und Erwachsenen, einschließlich der Neugeborenenperiode und im Nabelschnurblut, auffallend gleichförmig. Diese Tatsache lässt darauf schließen, daß die Leukocyten ihre Eigenschaften und ihre Struktur im Laufe des Lebens nicht wandeln. Das Ausmaß der Gerinnungsaktivität der Leukocyten ist offenbar größer als das der Erythrocyten, da wir mit einem Erythrocytenhämolysat von 9000 Zellen (dies entspricht der von uns verwendeten Leukocyten suspension) keine Erhöhung des Serumprothrombinverbrauchs sahen.

C. Die Sonderstellung des Nabelschnurblutes

Nabelschnurblut unterscheidet sich in vielen Eigenschaften vom Blut Neugeborener jenseits der ersten 12 Stunden. Es ist deshalb nötig, darauf besonders einzugehen.

Nach den Untersuchungen von KOCH findet man im Nabelschnurblut zur Zeit der Geburt im Durchschnitt 4,5 Mill. Erythrocyten und Hb-Werte von 15,7 g%. Schon 12 Stunden nach der Geburt beträgt der Hb- Wert 20 g%, und die Erythrocyten sind auf 5,5 Mill. angestiegen. Diese Werte bleiben bis zum Ende der Neugeborenenperiode konstant. Die vermehrte Erythropoese geht mit einer Erhöhung des Erythropoetins im Nabelschnurblut parallel, bei Frühgeborenen sind die Werte niedriger.

Auch der Erythrocytendurchmesser unterscheidet sich im Nabelschnurblut von dem älterer Neugeborener. Der mittlere Durchmesser beträgt bei der Geburt 7,9 μ . Er steigt unmittelbar danach auf 8,2 μ und bleibt bis zum Ende der Neugeborenenperiode konstant. Die Vergrößerung kommt durch eine Abflachung der Erythrocyten bei gleichbleibendem Einzelsvolumen zustande.

Bei der Geburt bestehen 70 bis 80% des Hämoglobins aus HbF, bei Frühgeborenen ist der Anteil noch höher. Schon in der Neugeborenenzeit findet ein Rückgang des HbF zugunsten des HbA statt.

Die Reduktionsfähigkeit für Methämoglobin ist im Nabelschnurblut vermindert.

Die gesteigerte Gerinnungsneigung des Nabelschnurblutes wird mit der qualitativen Abweichung einzelner Gerinnungsproteine, der hohen thromboplastischen Aktivität der fetalen Erythrocyten und der gesteigerten Fibrinogen-Fibrin-Umwandlungsgeschwindigkeit erklärt. Ob die Leukocyten des Nabelschnurblutes eine Sonderstellung gegenüber der Neugeborenenperiode einnehmen, ist bisher nicht bekannt. Da nach unseren Untersuchungen die Gerinnungsaktivität der Leukocyten keine Altersabhängigkeit zeigt, ist eine Ausnahmestellung der Nabelschnurleukocyten nicht anzunehmen.

D. Kritische Betrachtungen der Untersuchungsmethoden

Die quantitative, chemische Bestimmung des thromboplastischen Agens von Erythrocyten und Leukocyten ist bisher für klinische Zwecke nicht möglich. Die Bestimmung ihrer thromboplastischen Aktivität erfolgt daher durch Messung der Gerinnungszeit eines Gemisches von Serum, Erythrocyten bzw. Leukocyten, Thromboplastin, Fibrinogen und CaCl unter bestimmten Versuchsbedingungen (Prothrombin-verbrauchstest). Dieses Vorgehen hat zur Folge, daß Erythrocytenhämolysat und Leukocytensuspension zu Vollblut gegeben werden. Damit besteht, auch bei sonst gleichbleibenden Versuchsbedingungen, die Möglichkeit einer Beeinflussung, der Gerinnungszeit durch individuelle Besonderheiten der Hämostase.

Wir bemühten uns, diesen Faktor weitgehend auszuschalten, indem wir nach Möglichkeit immer den gleichen Blutspender nahmen, obwohl nach unseren Erfahrungen die Gerinnungszeit des Serums mit Testlösungen unabhängig von der Gerinnungszeit des Vollblutes war. Es ließ sich aber nicht vermeiden, daß die Blutentnahmen zu verschiedenen Zeiten erfolgten und somit Veränderungen im Gerinnungssystem bestanden, die nach unseren Erfahrungen nicht nur bei der Frau im Zusammenhang mit dem Menstruationscyclus, sondern in geringem Ausmaß bei jedem Individuum vorkommen.

Abweichende Ergebnisse bei der Ausführung des Prothrombin-verbrauchstests können auch zustande kommen, wenn die Gerinnungszeit zu verschiedenen Zeiten nach der Gerinnung des Vollblutes gemessen wird, denn nicht alles Thrombin wird zur Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin benötigt. Der Rest wird an das Fibringerinnsel adsorbiert und bei der Retraktion wieder freigesetzt. Diese erhöhte Thrombinkonzentration bewirkt eine verkürzte Gerinnungszeit.

Das Thrombin geht aber schnell in das inaktive Metathrombin über und die Gerinnungszeit entspricht dann dem Gehalt an noch vorhandenem Prothrombin. Es ist daher äußerst wichtig, diese in genau eingehaltenem zeitlichem Abstand nach Retraktion des Gerinnsels zu messen.

Ferner muß die Funktion der Thrombocyten bei der Blutgerinnung beachtet werden. Da die Aktivierung durch Kontakt mit benetzbaren Oberflächen erfolgt, haben wir alle verwendeten Gefäße und Instrumente silikonisiert. (vgl. S 5)

Über die Lagerungsstabilität der Testlösungen ist zu sagen, daß eine Aktivitätsminderung des Erythrocytenhämolysats auch nach einer Lagerung von 14 Tagen bei -20°C nicht eintritt. Dagegen müssen die Leukocytensuspensionen immer sofort verarbeitet werden, weil sonst die Zellen zusammenklumpen.

5. Zusammenfassung

=====

Wir untersuchten die thromboplastische Aktivität von Erythrocyten und Leukocyten bei Säuglingen von der Geburt bis zum Ende des ersten Lebenshalbjahrs und bei Erwachsenen mit Hilfe des Serumprothrombinverbrauchstests. Die Testlösungen wurden in 40 Versuchsanordnungen dem Venenblut von 4 gesunden Erwachsenen zugesetzt. Als Bezugswert diente der Serumprothrombinverbrauch dieser Personen ohne Zusatz der Testlösungen.

I) Erythrocyten

Geprüft wurde das Erythrocytenhämolysat aus 72 Nabelschnurblutproben und Blut von 31 reifen und 11 unreifen Neugeborenen, sowie von 10 Säuglingen im ersten Lebenshalbjahr und 22 Erwachsenen.

In Übereinstimmung mit der Literatur fanden wir eine gleich große thromboplastische Aktivität bei fetalen Erythrocyten (Nabelschnurblut) und Erwachsenenerythrocyten. Wir stellten aber überdies fest, daß die Gerinnungsaktivität der roten Blutzellen nicht in allen Lebensaltern gleich ist.

Die thromboplastische Aktivität ist am höchsten im Nabelschnurblut und bei Erwachsenen. Etwas geringer, jedoch nicht signifikant erniedrigt, ist sie bei reifen und unreifen Neugeborenen. Im ersten Lebenshalbjahr, jenseits der Neugeborenenperiode, ist dagegen die Gerinnungsaktivität signifikant gegenüber den anderen Lebensaltern erniedrigt, wie wir erstmalig zeigen konnten.

II) Leukocyten

Wir prüften Leukocyten suspensionen aus 30 Nabelschnurblutproben und Blut von 12 reifen Neugeborenen, 10 Frühgeborenen im Alter von 1 - 8 Wochen, sowie 7 Säuglingen im ersten Lebenshalbjahr und 25 Erwachsenen.

Die thromboplastische Aktivität ändert sich in den einzelnen Lebensaltern nicht; auch das Nabelschnurblut macht in dieser Hinsicht keine Ausnahme. Vergleichszahlen für das Kindesalter liegen in der Literatur bisher nicht vor.

Bei einem Vergleich der thromboplastischen Aktivität von Erythrocyten und Leukocyten zeigte sich, daß ein Erythrocytenhämolysat der gleichen Zellzahl wie die Leukocyten suspension keine Gerinnungsaktivität besitzt; demnach kommt auch den Leukocyten insbesondere für die Bildung des Gewebsthromboplastins eine Bedeutung zu.

Literatur

=====

BRADLOW B.

British J. Haemat. 7, 476 (1961)

Liberation of Material with Plateletlike Coagulant Properties
from Intakt Red Cells and Particularly from Reticulocyts

BELLER F.K.

Joh. Ambrosius Barth-Verlag, Leipzig (1957)

Die Gerinnungsverhältnisse bei der Schwangeren und beim Neuge-
borenen

FISCHER R.A. - YATES Fr.

Wissenschaftliche Tabellen Geigy (1956)

GOLLUB S.

Fed. Proc. 12, 54 (1953)

Thromboplastic Potency of Whole Blood Components

HRODEK O.

Ann. paediat. 192, 129 (1959)

HAGITTE B.

Inaug.Diss. Leipzig (1956)

Beitrag zum Prothrombinkonsumptionstest

JÜRGENS J. - BELLER F.K.

Georg Thieme Verlag , Stuttgart (1962)

Blutgerinnungsanalyse

KEPP - OEHLERT

Blutbildung und Blutumsatz beim Feten und Neugeborenen

Dort :

LÖHR G. - WALLER D.

Erythrocytenfermente

KÜNZER W.

Rotes Blutzellensystem beim Feten und Neugeborenen

BETKE K.

Der Blutfarbstoff des Feten

GÖLTNER E.

Erythropoetin. Neue Untersuchungen zum Nachweis im Nabel-
schnurblut

KOCH F.

Bluteiweißuntersuchungen beim Neugeborenen unter Berücksich-
tigung der Gerinnungsstörungen

KÜNZER W.

Fünfter Europ.Kongr. der Soc.Haematol. -Freiburg i.Br. 619
Zur Gerinnungsaktivität des Nabelschnurerythrocytenhämolysats

KÜNZER W. - STRÖDER J.

Ann.pädiat (Basel) 188, 215 (1957)

Gerinnungsstudien bei Kindern:Vergleichende Untersuchungen
der Aktivitätsverluste von Gerinnungsfaktoren am aufbewahrten
Nabelschnur- und Erwachsenenblut

LI J.G. - OSGOOD E.E.

Blood 4, 670 (1949)

A Method for the Rapid Separation of Leucocytes and Nucleated
Erythrocytes from Blood or Marrow with a Phythemagglutinin from
Red Beans (Phaseolus vulgaris)

LÖHR G. - WALLER D.

Deutsche med.Wschr. 89, 171 (1964)

Enzymverteilmuster und Energiestoffwechsel normaler und
leucämischer weißer Blutzellen des Menschen

OEHME J.

Maschr.Kinderheilk. 112/447 (1964)

Über die physiologischen Grundlagen der Blutstillung Neugeborener

PALMER G.E. - CHEN H.P.

Amer. J.Clin.Pathol. 30, 567 (1958)

A Method for Isolating Leucocytes

QUICK A.J.

Amer.J.Med.Sci. 239, 101, (1961)

Influences of Erythrocytes on Blood Coagulation

QUICK A.J. - GEORGATSOS J.G. - HUSSEY C.V.

Amer.J.Med.Sci.228,207 (1954)

The Clotting Aktivity of Human Erythrocytes: Theoretical and
Clinical Implications

ROGNER G.

Zschr.Kinderheilk. 84, 197 (1960)

Die Blutgerinnung bei Frühgeburten

SCHULZE H.E. - SCHWICK G.

Laboratoriumsblätter 1961 - Behringwerke/Marburg

SHINOWARA G.Y.

J.Lab. and. Clin. Med. 38, 11 (1951)

Enzyme Studies on Human Blood

SKOOG W.A. - BECK W.S.

Blood XI, 436 (1956)

Studies on the Fibrinogen, Dextran, Phythemagglutinin Methods
of Isolating Leucocytes

WOOLDRIDGE I.

The Practitioner 36, 187 (1886)

Relations of the Red Cells to Coagulation

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 16.Dezember 1939 als erstes Kind des Bauingenieurs Philipp Herber und seiner Ehefrau Josefine, geb. Stockmann, in Camberg geboren.

Dort besuchte ich von 1946 - 1950 die Volksschule und anschließend zwei Jahre lang eine Mittelschule. Von 1952 bis zum Abitur im Februar 1959 besuchte ich das Realgymnasium in Limburg. Anschließend begann ich im Sommersemester 1959 mit dem Medizinstudium an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt, wo ich im Februar 1962 das Physikum bestand. Danach studierte ich zwei Semester an der Leopold-Franzens-Universität in Innsbruck. Im Sommer 1963 setzte ich mein Studium an der Philipps-Universität in Marburg fort und beendete es dort am 11.November 1965 mit dem medizinischen Staatsexamen.

Im Januar 1966 begann ich meine Ausbildung als Medizinalassistentin an der Kinderklinik der Städtischen Krankenanstalten in Braunschweig (Chefarzt Prof.Dr.J.Oehme).

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Frankfurt:

Czerny, Egle, Giersberg, Heinz, Müser, Royen, Ortmann, Starck, Wezler und Wieland.

in Innsbruck:

Asperger, Gabl, Ganner, Halhuber, Hittmair, Huber, Konzett, Lang, Rößler, Ruckensteiner, Scharfetter, Scheminzky, Schinzel, Steiner und Tapfer.

in Marburg :

Beckmann, Berendes, Bickel, Braun-Falco, Buchholz,
Deicher, Dittrich, Exner, Gedigk, Hamm, Hartmann,
Heuser, Hornung, Huber, Jacob, Linneweh, Mann,
Martini, du Mesnil de Rochemont, Neubauer, Oehme,
Oehmig, Overbeck, Poetschke, Rohen, Salfeld, Sauer,
Schiff, Schleyer, Schmid, Schölmerich, Schrappe,
Schwaiger, Siegert, Siess, Spiegelberg, Straub,
Streicher und Würterle.

Zum Schluß möchte ich für alle Unterstützung
bei der Fertigstellung dieser Arbeit herzlich
danken, vor allem meinem Doktor-Vater, Herrn
Prof.Dr.J.Oehme, für die mir jederzeit
freundlich gewährte Hilfe.

